

# 修 士 学 位 論 文

類似構造を有するアゾ化合物の遺伝毒性と立体構造の比較による、  
遺伝毒性につながる立体化学構造の解明

指導教授          廣田 耕志          教授

平成   29年   2月   17日   提出

首都大学東京大学院

理工学研究科   分子物質化学   専攻

学修番号   15880308

氏   名   大岡 正人

## 学位論文要旨（修士（理学））

大岡 正人

### 類似構造を有するアゾ化合物の遺伝毒性と立体構造の比較による、 遺伝毒性につながる立体化学構造の解明

#### 【序論】

近年多くの合成化合物が食品や衣類等の工業製品に使用されている。合成化合物の中には発がん性が疑われているものも少なくない。それらの化合物の安全性試験にはサルモネラ菌を用いた Ames 試験や動物細胞を用いた小核試験等が行われている。しかし、これらの方法では化合物によってどのような損傷が誘導されるのかまでは特定することは出来ない。損傷の種類を特定するため、DNA 損傷の種類を DNA 二本鎖切断、DNA 一本鎖切断、鎖間架橋、塩基損傷の 4 種に分類した。DNA 二本鎖切断は最も重篤な損傷であり、修復されないまま細胞内に残ると細胞死や細胞のガン化を誘導する。この損傷は Rad54 等による相同組換えの経路や Ku70 等による非相同末端結合の経路によって修復される。当研究室ではニワトリ B リンパ球細胞 DT40 においてそれぞれの DNA 修復経路が欠損した細胞を作製し、化学物質の遺伝毒性試験法を開発してきた。この方法では、特定の化学物質に暴露した後の生存率低下を DNA 修復経路の変異体と野生型の間で比較し、変異型細胞が野生型に対して有意な生存率低下を示した場合、その化合物は DNA を損傷すると結論できることを原理としている。この方法では、高感度かつ偽陽性を避けて遺伝毒性を評価することが出来る。また、この方法を用いることで化合物が DNA 損傷を誘導するかどうかのみだけでなく、どのような損傷を誘導するかまで調べることが出来る {1}。

これまで個別の化合物の毒性に関して、様々な方法で遺伝毒性は検討されてきたが、遺伝毒性を示す化学物質のどのような立体化学構造が、遺伝毒性の原因となるのかほとんど理解が進んでいない。本研究では構造式の類似した 3 種のアゾ化合物に対して上記の遺伝毒性試験を行うとともに、化合物の立体化学構造計算を行い、これらを比較することで遺伝毒性を引き起こす化合物の構造を解明することを目的とした。

#### 【結果・考察】

本研究では化学構造のよく似た 3 種のアゾ化合物、Sudan I、OrangeG、Orange II の遺伝毒性を試験した。序論に挙げたそれぞれの損傷を修復することが出来ない変異細胞と野生型細胞に対してアゾ化合物を暴露し、細胞の生存率を比較することで遺伝毒性を調べた。生存

率試験は液体培地で細胞を培養し、ATP 量によって生存率を測定する ATP assay 法とメチルセルロース培地で細胞を培養し、生えたコロニーの数で生存率を算出する colony assay 法の 2 通り行った。どちらの試験でも、Sudan I のみに対して RAD54/KU70 変異体が、野生型細胞に対して有意に強い感受性を示した。RAD54/KU70 変異体は DNA 二本鎖切断を修復する経路が機能しなくなっているため、DNA 二本鎖切断に高感受性を示すことから、Sudan I によって DNA 二本鎖切断が誘導されるということが示唆された。さらに、DNA 二本鎖切断に蓄積する  $\gamma$  H2AX の免疫染色を行い、Sudan I 処理時に  $\gamma$  H2AX の蓄積が増加することを確認した。続いて、Sudan I 処理による M 期の染色体断裂の増加を調べたところ、3 時間処理した細胞では染色体断裂の増加が確認されなかったのに対し、16 時間処理では染色体断裂の増加を確認した。3 時間処理では G2 期の細胞のみが M 期に入るため、染色体の断裂が DNA 複製に依存して発生するのかを調べる事が出来る {2}。この結果から Sudan I による DNA 二本鎖切断の誘導は複製を介して起こっているということが示唆された。これらの結果から Sudan I によって DNA 二本鎖切断が誘導されていることが明らかとなった。化学構造式の似た 3 種の化合物の遺伝毒性の違いが何に起因するのかを調べるため、理論化学計算ソフト Gaussian を使用し、3 種の化合物の立体構造を計算した。その結果興味深いことに Sudan I のみが完全な平面構造を取っていることが明らかとなった。また、Orange II と Orange G はスルホン基を構造中に含むため、非常に嵩高く、負にチャージしていることがわかった。Sudan I による DNA 二本鎖切断の誘導は複製依存的に起こっているため、Sudan I が塩基間にインターカレートし、複製フォークが停止・崩壊することで DNA 二本鎖切断が生じるというモデルが示唆された。

#### 【展望】

今回試験した化合物は 3 種のみであり、DNA 二本鎖切断の誘導のきっかけとなる構造が平面構造以外にあるかどうかは明らかとなっていない。様々な化合物について遺伝毒性試験を行い、DNA 二本鎖切断を誘導する化合物に共通した構造的特徴を明らかにすることを目的に今後研究を推進する。

- 1, Sangwoo Lee, Xiaoshan Liu, Shunichi Takeda, Kyungho Choi (2013) Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: A comparison study employing chicken DT40 cells. Chemosphere 93 : 434-440
- 2, Eiichiro Sonoda, Takashi Okada, Guang Yu Zhao, Satoshi Tateishi, Kasumi Araki, Masaru Yamaizumi, Takashi Yagi, Nicole S.Verkaik, Dik C.van Gent, Minoru Takata and Shunichi Takeda(2003) Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of pol $\zeta$  in maintaining genome stability in vertebrates. The EMBO Journal 22: 3188-3197

# 目次

1. 序論	4
2. 実験材料と実験方法	6
2.1 使用した試薬	6
2.2 使用した機器	8
2.3 使用した遺伝子破壊株	8
2.4 実験方法	9
3. 実験結果	12
3-1 アゾ染料の遺伝毒性試験	12
3-2 DT40 変異株と S9mix 処理を融合した実験系の確立	21
4. まとめと考察	30
5. 参考文献	31
謝辞	35

## 1. 序論

近年多くの化学物質が生産、使用されている。それらの化学物質やその副産物が健康に悪影響を及ぼす可能性が問題視されており、その安全評価が必要不可欠である。遺伝毒性試験の目的は体細胞や生殖細胞に突然変異を引き起こし、健康に悪影響を与える物質の同定をし、健康リスク評価に役立てることである。現在行われている遺伝毒性試験方法は培養細胞や菌を使用する *in vitro* 試験とマウスなどの動物を使用する *in vivo* の試験等が挙げられる。*In vitro* の試験ではヒスチジン要求性のサルモネラ菌に化学物質を暴露し復帰突然変異率によって変異原性を評価する Ames 試験や動物細胞に化合物を暴露した際の染色体の異常を観察する染色体異常試験等がある。一方、*In vivo* の試験ではマウスに継続的に化学物質を投与し、発がんによる死亡率を調べたり、変異の蓄積を解析したりすることで化学物質の遺伝毒性を評価する。しかし、これらの方法では化合物によってどのような種類の DNA 損傷が誘導されるのかまでは特定することは出来ない。化合物が誘導する DNA 損傷の種類を推定することは、化合物が DNA を損傷する分子機構を理解する上で必須である。損傷の種類を推定するために、DNA 損傷の種類を DNA 二本鎖切断、DNA 一本鎖切断、鎖間架橋、塩基損傷の 4 種に分類し、各種損傷の修復を担当する経路の因子を欠損した変異体パネルを用いて、化合物の遺伝毒性について解析した(Fig. 1)。

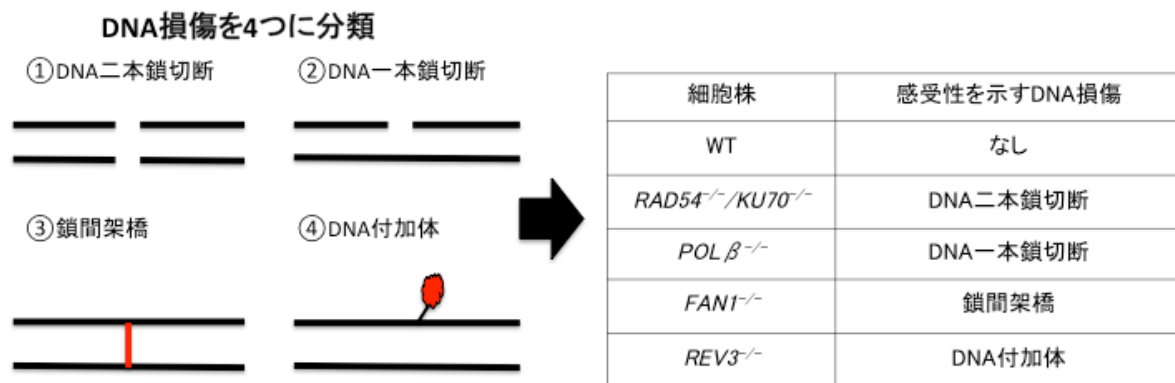


Fig.1

4 種に分類した DNA 損傷の種類とそれぞれに感受性を示す細胞株

DNA 損傷を大きく 4 つに分類(左図)し、それぞれの損傷の修復に関わるタンパク質をコードする遺伝子を破壊した細胞を使用した(右図)。

DNA 二本鎖切断は DNA 二本鎖の両方が切断される最も重篤な損傷であり、修復されないまま細胞内に残ると細胞死や細胞のガン化を誘導する。この損傷は Rad54 等による相同組換えの経路や Ku70 等による非相同末端結合の経路によって修復されるため、*RAD54/KU70* 二重欠損細胞はこの損傷に対して超感受性を示す<sup>1,2</sup>。DNA 一本鎖切断は細胞内で最も高頻度に起こる損傷で DNA 二本鎖のうち一方が切断される損傷である。この損傷は *Polβ* 等によって修復されるため、*POLβ* 欠損細胞はこの損傷に対して高感受性を示す<sup>3,4</sup>。鎖間架橋は DNA 二本鎖の間で共有結合が形成される損傷である。この損傷は *Fan1* 等によるファンconi経路で修復されるため、*FAN1* 欠損細胞はこの損傷に対して高感受性を示す<sup>5</sup>。塩基損傷はメチル基やアルキル基等が DNA に共有結合するような損傷である。その耐性化には損傷乗り越え合成が重要な役割を果たしている。Rev3 は損傷乗り越え合成で重要な役割を果たすタンパク質であるため、*REV3* 欠損細胞はこの損傷に対して高感受性を示す<sup>6</sup>。当研究室ではニワトリ B リンパ球細胞 DT40 においてそれぞれの DNA 修復経路が欠損した細胞を作製し、化学物質の遺伝毒性試験法を開発してきた(Fig. 1)。この遺伝毒物学を用いた方法では、特定の化学物質に暴露した後の生存率低下を DNA 修復経路の変異体と野生型の間で比較し、変異型細胞が野生型に対して有意な生存率低下を示した場合、その化合物は DNA を損傷すると結論できることを原理としている(Fig. 2)。

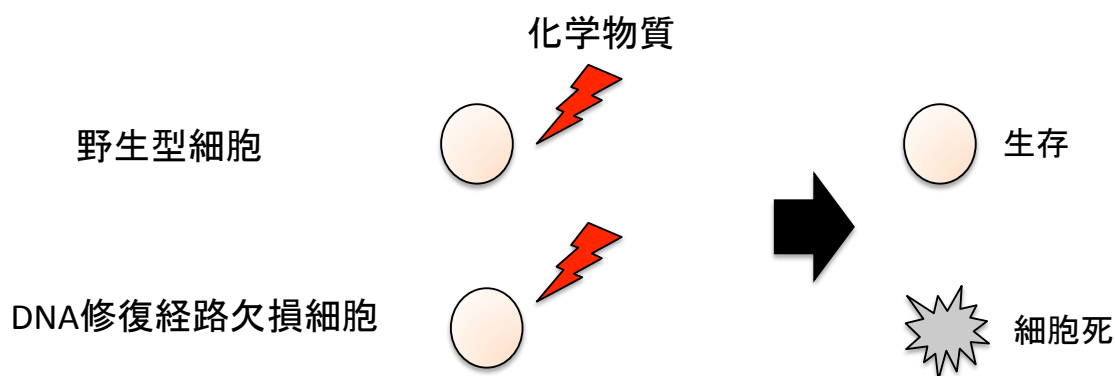


Fig. 2 遺伝毒物学手法の概略図

野生型細胞と DNA 修復経路が欠損した細胞に遺伝毒性を調べたい化合物を同様に暴露し、DNA 修復経路欠損細胞でのみ生存率が低下した場合試験した化合物は遺伝毒性があると判断する。

この方法では、高感度かつ偽陽性を避けて遺伝毒性を評価することが出来る。また、この方法を用いることで化合物が DNA 損傷を誘導するかどうかのみだけでなく、どのような損傷を誘導するかまで調べることが出来る。本研究では構造の類似した 3 種の化合物の遺伝毒性とその立体化学的構造の特徴の関係を調査した<sup>7</sup>。また、これまで DT40 の変異型細胞では遺伝毒性試験が困難であった代謝毒物の毒性評価法を確立した<sup>8</sup>。

変異原性、遺伝毒性、発がん性について

変異原性

OECD<sup>9</sup>(Organization for Economic Co-operation and Development)のガイドラインでは、変異原性はより狭義の言葉で次世代へと引き継がれる DNA の変化や染色体構造の異常を引き起こす性質としている。従って変異原性は以下の 4 点を含む。1)単一塩基の置換や遺伝子、遺伝子断片の欠損、染色体の欠失 2)染色体の欠失や転座を引き起こす染色体断裂 3)染色体の異数化 4)有糸分裂期の組換え

遺伝毒性

遺伝毒性は変異原性に比べて広義の意味で用いられており、変異原性に加えて DNA の構造や遺伝情報に変化をもたらすが、次世代へ引き継がれないような DNA 損傷等も含

むとしている<sup>9</sup>。

## 発がん性

がんは多段階の過程によって引き起こされる遺伝子の病気である。その中には突然変異の誘発やがん細胞の増殖を阻害するような免疫システムの妨害などが挙げられる。発がん性とは細胞のがん化の過程のいずれかのステップに関わる性質である<sup>10</sup>。



## 2 実験材料と実験方法

### 2.1 使用した試薬

○使用した試薬

細胞培養用培地 RPMI1640

L-グルタミン溶液

ペニシリンストレプトマイシン混合溶液

チキンシーラム

2-メルカプトエタノール

Fetal-bovine Serum

DMEM-Ham's F12

DMSO

S9 ミックス(染色体異常試験用)

Cell-titer glo

ギムザ染色液

PBS

コルセミド溶液

マルチマウント 480

パラホルムアルデヒド

$\gamma$  H2AX 抗体

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG 抗体

DAPI

NaCl

KCl

$\text{Na}_2\text{HPO}_3$

$\text{KH}_2\text{PO}_4$

NP40

BSA

Tween20

メタノール

酢酸

アセトン

ナカライ

ナカライ

ナカライ

Gibco-BRL

Invitrogen

AusgeneX

GE

和光純薬

家田化学薬品

プロメガ

ナカライ

和光純薬

Gibco-BRL

松浪硝子

和光純薬

Millipore

Invitrogen

vector laboratories

和光純薬

和光純薬

国産化学

和光純薬

シグマ

ナカライ

関東化学

和光純薬

和光純薬

和光純薬

Sudan I	純正化学
Orange II	和光純薬
Orange G	ナカライ
ベンゾピレン	シグマ
N-ニトロソジメチルアミン	和光純薬

#### 調製試薬

##### 細胞培養用培地

・ RPMI1640	500ml
・ Fetal-Bovine Serum	50ml
・ チキンシーラム	5ml
・ ペニシリンストレプトマイシン混合溶液	5ml
・ L-グルタミン溶液(200mmol/L)	5ml
・ 2-メルカプトエタノール (50mM)	500μl

##### コロニーアッセイ用メチルセルロース培地

・ 水	500ml
・ メチルセルロース	7.5g
・ DMEM Ham's F12	1 袋
・ Fetal-Bovine Serum	75ml
・ チキンシーラム	5ml
・ L-グルタミン溶液(200mmol/L)	5ml
・ 2-メルカプトエタノール (50mM)	500μl

#### Carnoy's Solution

メタノール：酢酸＝3：1 で混合した。

#### PBS

粉末になっている PBS を水で希釈して使用した。

#### PBST

1 × PBS に Tween20 を 0.05% になるように混合した。

1%BSA/PBST

1ml の PBST に 10mg の BSA を加えて溶かした。

## 2.2 使用した機械

遠心機 (KUBOTA)

CO<sub>2</sub> incubator (SANYO)

EVWD 0.3 (NIKON)

ECLIPSE 90i (NIKON)

Ni-U (NIKON)

Cyto-Tec (SAKURA)

Fluoroscanner Ascent FL (ThermoFisher)

## 2.3 使用した遺伝子破壊株

*RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>・・・DNA 二本鎖切断に高感受性

DNA 二本鎖切断は主に相同組換えの経路と非相同末端結合の経路の 2 つの経路によって修復される。相同組換えの経路では Rad51 を中心として、Rad54 や MRN 複合体等が働き、姉妹染色体を鋳型に DNA 複製を行うことで DNA 二本鎖切断の修復を完了する。非相同末端結合では Ku70/Ku80 ヘテロ複合体が中心となり、二本鎖切断部位の DNA 末端同士を結合させることで修復を完了させる。*RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>の 2 重欠損株ではそのどちらの経路も機能が減弱しているため、DNA 二本鎖切断を修復することが出来ず、二本鎖切断を誘導する薬剤で処理した際に強い感受性を示す<sup>2</sup>。

*POL β*<sup>-/-</sup>・・・DNA1 本鎖切断に高感受性

細胞内の DNA に最も多く入る損傷が DNA 一本鎖切断であり、1 日に数千もの損傷が誘導されることが知られている。その損傷の修復は *XRCC1* や Pol β、*PARP* 等の酵素によって行われている。そのため、*pol β*<sup>-/-</sup>の細胞は DNA 一本鎖切断を誘導する薬剤に対して高感受性を示す<sup>3,4</sup>。

*FANCI*<sup>-/-</sup>・・・鎖間架橋に高感受性

鎖間架橋は二本鎖 DNA の向かい合う塩基同士が共有結合をすることで形成される損傷である。このタイプの損傷の修復にはファンコニタンパクと呼ばれる複数の酵素が関わっ

ている。Fan1 もその酵素の中の 1 つであり、*FAN1*<sup>-/-</sup>の細胞では、鎖間架橋を誘導する薬剤に対して高感受性を示す<sup>5</sup>。

#### *REV3*<sup>-/-</sup>・・・塩基損傷に高感受性

DNA 複製は複製ポリメラーゼと呼ばれる酵素によって行われる。DNA 複製時に複製ポリメラーゼがアルキル化等の DNA 上の損傷にぶつくと複製ポリメラーゼは塩基を挿入することが出来ず、その部位で停止してしまう。その複製停止の解除に働くのが損傷乗り越え合成である。損傷乗り越え合成は、損傷乗り越えポリメラーゼと呼ばれる特殊なポリメラーゼが損傷した塩基の向かいに塩基を挿入する”その場しのぎ”の DNA 合成である。Rev3 は損傷乗り越えポリメラーゼの活性サブユニットであり、*REV3*<sup>-/-</sup>の細胞では損傷を乗り越えて DNA 合成をすることが出来ないため、DNA 付加体に対して高感受性を示す<sup>6</sup>。

## 2.4 実験方法

### ・ ATP assay

指数増殖期にある細胞を  $1 \times 10^4$ /ml に希釈し、24well プレートに 1ml ずつ分注した。毒性を評価する化合物を目的の濃度になるように添加した。39.5℃で 2 日間培養し、細胞培養液をよく懸濁した後、100μl を 96well プレートに移した。細胞を移した well に cell-titor glo を 50μl 加え、Fluoroskan ascent FL プレートのリーダーにセットした。1 分間のインターバルを置きながら 5 分間 120rpm でプレートをシェイクした。各 well の ATP 発光量を測定し、化合物を添加しなかった well の測定値を生存率 100%の値とし、各濃度での生存率を算出した。

### ・ Colony assay

メチルセルロース培地に毒性を評価する化合物を目的の濃度になるように添加し、1 晩 4℃で攪拌した。化合物を混ぜたメチルセルロース培地を 6well プレートに 5ml 移し、4 時間 39.5℃で温めた。温めたメチルセルロース培地に細胞の個数を振って撒き、1 週間 39.5℃で培養した。生えて来たコロニーの数をカウントし、各濃度で(生えて来たコロニーの数)/(撒いた細胞の数)を計算した。毒無しの well での(生えて来たコロニーの数)/(撒

いた細胞の数)を生存率 100%とし、各濃度での細胞の生存率を算出した。

- ・ 染色体断裂試験

#### ■16 時間暴露

細胞を  $4 \times 10^5/\text{ml}$  の濃度になるように希釈し、化合物を添加して 16 時間培養した。13 時間経過時にコルセミド溶液を最終濃度が 100ng/ml になるように加えた。

#### ■3 時間暴露

細胞を  $1 \times 10^6/\text{ml}$  の濃度になるように調製し、化合物とコルセミドを同時に加えて 3 時間培養した。

#### ■サンプルスライド作製

細胞を遠心して回収し、1ml の 75mM KCl に懸濁して細胞を破裂させた。5ml の Carnoy's solution で細胞を固定した。遠心して細胞を回収し、5ml の Carnoy's solution を加えて 30 分間室温で処理した。その後遠心して細胞を回収し、100 $\mu\text{l}$  の Carnoy's solution に懸濁してスライドガラス上に懸濁液を滴下した。スライドガラスを乾燥させ、10 分間 5%ギムザ染色液に浸けて染色した。水道水でスライドガラスの裏側から水をかけてギムザ染色液を洗った後、アセトンで 3 回洗った。42°C に調節したホットプレート上にスライドガラスを置いてアセトンを完全に揮発させ、マルチマウントオイルを 2 滴たらしてカバーガラスで封入した。

#### ■ 染色体断裂の評価

作製したスライドガラスを顕微鏡で観察し、姉妹染色体間で同じ位置に断裂が入っているものを isochromatid break、姉妹染色体の片方に断裂が入っているものを chromatid break、他の染色体と不自然に結合しているものを chromatid exchange としてカウントした。DT40 の染色体は顕微鏡下で目視できるマクロ常染色体が 11 本 (1-5 番染色体、2 番染色体はトリソミー)、性染色体が ZW の 2 本、顕微鏡下で目視困難であるマイクロ常染色体が 67 本の合計 80 本となっている<sup>2</sup>。このうち、目視困難である 67 本のマイクロ染色体と W 染色体を除いた、11 本のマクロ常染色体と Z 染色体のみを観察して断裂の数を数えた。

- ・ 免疫染色

#### ■ サンプルスライド作製

薬剤で処理した細胞としていない細胞を遠心機を用いてスライドガラス上に乗せた。バップペンで細胞を置いた位置を縁取り、4%PFA で 10 分間固定した。その後、PBS で 5 分間 2 回洗浄し、0.1%NP40/PBST で 10 分間処理して細胞を破裂させた。破裂させた細胞を PBS で 5 分間 2 回洗浄し、3%BSA/PBST でブロッキングした。3% BSA/PBST で 500 倍に希釈した 1 次抗体(Ser139 がリン酸化されたヒストンを認識するマウスのモノクローナル抗体)を 50 $\mu$ l 細胞の上に乗せ、37°C で 45 分間インキュベートした。1 次抗体終了後、PBS で 5 分間 3 回洗浄し、3%BSA/PBST で 500 倍に希釈した 2 次抗体(FITC 抗マウス抗体)を 50 $\mu$ l 細胞に乗せて 37°C で 45 分間インキュベートした。2 次抗体終了後、PBS で 5 分間 3 回洗浄したのち、DAPI を含むオイルを細胞に乗せてカバーガラスをかけ、トップコートでコーティングしてカバーガラスを固定した。作製したサンプルスライドを蛍光顕微鏡で観察し、1 細胞あたり 5 個以上の  $\gamma$ H2A の蓄積が見える物をポジティブとした。

- ・ S9mix 処理

毒性を評価する化合物と S9mix 溶液を 1 : 9 の割合で混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。

- ・ 量子化学計算による分子構造の最適化

Gaussian ソフトウェアを用いて密度汎関数法によって行った。溶媒には水を選択し、GaussView を用いて初期構造を入力した。分子構造の最適化には Becke-Lee-Yang-Parr(B3LYP)<sup>11,12</sup> パラメータを使用した。規定関数には 6-31G(d,p)を全原子に適応して計算した。最適化構造はエネルギーの極小値で初期に指定した化学構造にもっとも近いものが計算結果として表示される。

## 3 実験結果

### 3-1 アゾ染料の遺伝毒性試験

アゾ化合物とは化学構造式中にアゾ結合( $\text{-N=N-}$ )を持つ化合物の総称である。アゾ化合物は繊維製品や革製品、紙、化粧品等の様々な工業製品に使用されており、年間 80 トン以上生産されている<sup>13</sup>。本研究ではアゾ化合物の中で化学構造の類似した Sudan I、Orange II、Orange G の遺伝毒性調査を行った(Fig. 3)。Ames 試験やマウスリンパ腫形成試験によって Sudan I の遺伝毒性は既に報告が成されているが<sup>14,15</sup>、Orange II と Orange G の遺伝毒性については明らかとなっていない<sup>16,17</sup>。また、遺伝毒性物質と非遺伝毒性物質の立体化学構造についての理解はほとんど成されていない。それらの関係を明らかにすることは化学物質の構造的な特徴からその遺伝毒性を推測出来るようになることに繋がる。遺伝毒性の推測が出来るようになることはこれまで化学物質毎に行っていた毒性評価の結果からのみだけでなく、化学物質の特徴からも実際に食品等に使用可能かどうかの判断を出来るようになることに繋がる。化学物質の構造の特徴として立体構造に着目した。化学物質の立体構造の計算は Gaussian09<sup>18,19,20</sup> を用いて計算することが出来る。

アゾ染料の中には遺伝毒性が疑われているものも数多くあり、Orange II、Orange G のその中の 1 つである。先に述べたように、Sudan I は既に遺伝毒性の報告があるが、Orange II、Orange G についての報告はない。そのため、構造が類似したこれら 3 種の化合物の遺伝毒性評価を行うことで構造が類似した化合物の遺伝毒性の違いを検証しようと試みた。DNA 修復経路欠損細胞と理論化学計算を組み合わせることでアゾ化合物の遺伝毒性を評価するのに加え、遺伝毒性を持つ要因となる立体化学構造的な特徴を調査した。

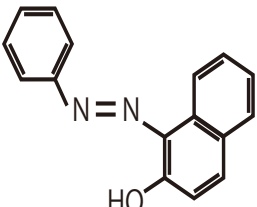
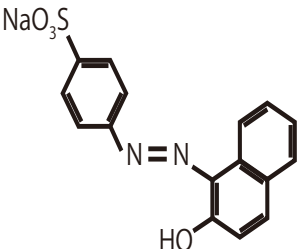
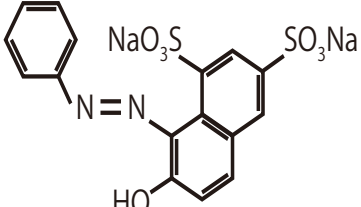
	Sudan I	Orange II	OrangeG
化学構造			

Fig. 3 遺伝毒性を試験した 3 種のアゾ化合物

### *Sudan I* のみが DNA 二本鎖切断を誘導する

Sudan I、Orange II、Orange G によって誘導される DNA 損傷の種類を特定するため、DT40 変異株と野生型細胞に対してそれぞれの化合物の入った液体培地中で 2 日間細胞を培養し、ATP assay により生存率を測定した。この方法は 100  $\mu$ l の細胞液内に含まれる細胞を溶かし、その中に含まれる ATP の量をルシフェラーゼの発光量によって間接的に測定する。化合物を加えない条件で培養した細胞懸濁液でのルシフェラーゼ発光量を生存率 100%とし、化合物を加えた細胞懸濁液でのルシフェラーゼ発光量から生存率を計算した。その結果、*RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>変異株が Sudan I のみに対して感受性を示し、*POL*  $\beta$ <sup>-/-</sup>、*REV3*<sup>-/-</sup>、*FAN1*<sup>-/-</sup>の変異株は感受性を示さなかった (Fig. 4)。*RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>変異株は DNA 二本鎖切断を修復することが出来ず、DNA 二本鎖切断に対して高感受性を示す<sup>21</sup>。この結果から Sudan I によって DNA 二本鎖切断が誘導されることが示唆された。この生存率試験の結果を検証するため、コロニーassay によっても生存率試験を行った。この手法ではゼリー状のメチルセルロース培地に細胞を撒き、よく混ぜてから 1 週間程培養する。1 週間程で生細胞はコロニーを形成する。生えて来たコロニーの数を撒いた細胞の数で割った値を化合物有りとしの条件で比較することで生存率を算出する。こちらの実験でも Sudan I に対して *RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>変異株のみが野生型に対して有意な生存率の低下を示し、他の 3 種の変異株は感受性を示さないという結果を得た (Fig. 5)。また、Orange II、OrangeG に対してはどの変異株も感受性を示さなかった (Fig5)。



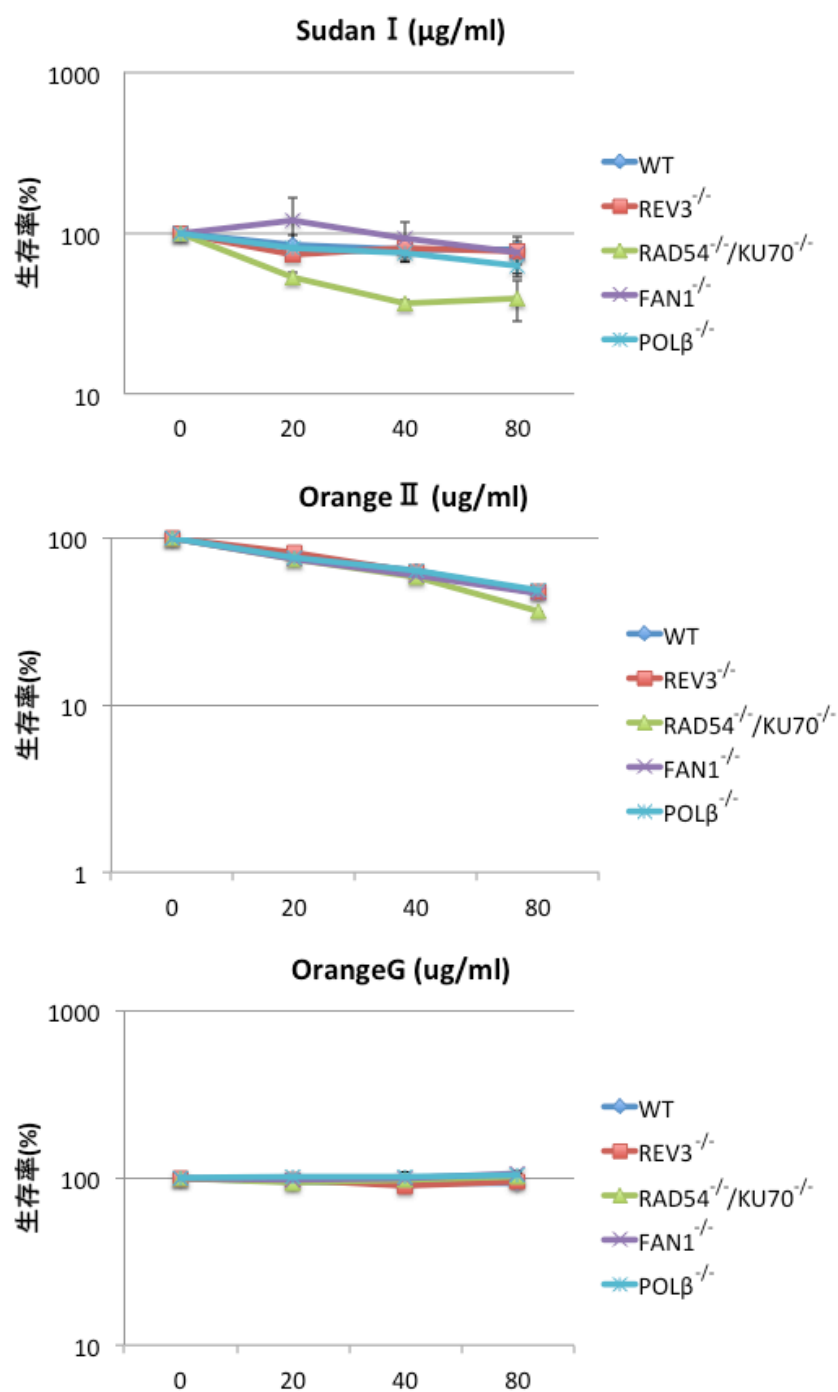


Fig. 4 ATP assay 法による 3 種のアゾ化合物の遺伝毒性試験

*RAD54<sup>-/-</sup>/KU70<sup>-/-</sup>*変異株のみが Sudan I に対して感受性を示し、*REV3<sup>-/-</sup>*、*FAN1<sup>-/-</sup>*、*POLβ<sup>-/-</sup>*変異株は感受性を示さなかった。このことは Sudan I によって DNA 二本鎖切断が誘導されていることを示唆している。また Orange II、Orange G によっては何の変異株も感受性を示さなかった。エラーバーは 3 回の実験の標準誤差を示している。

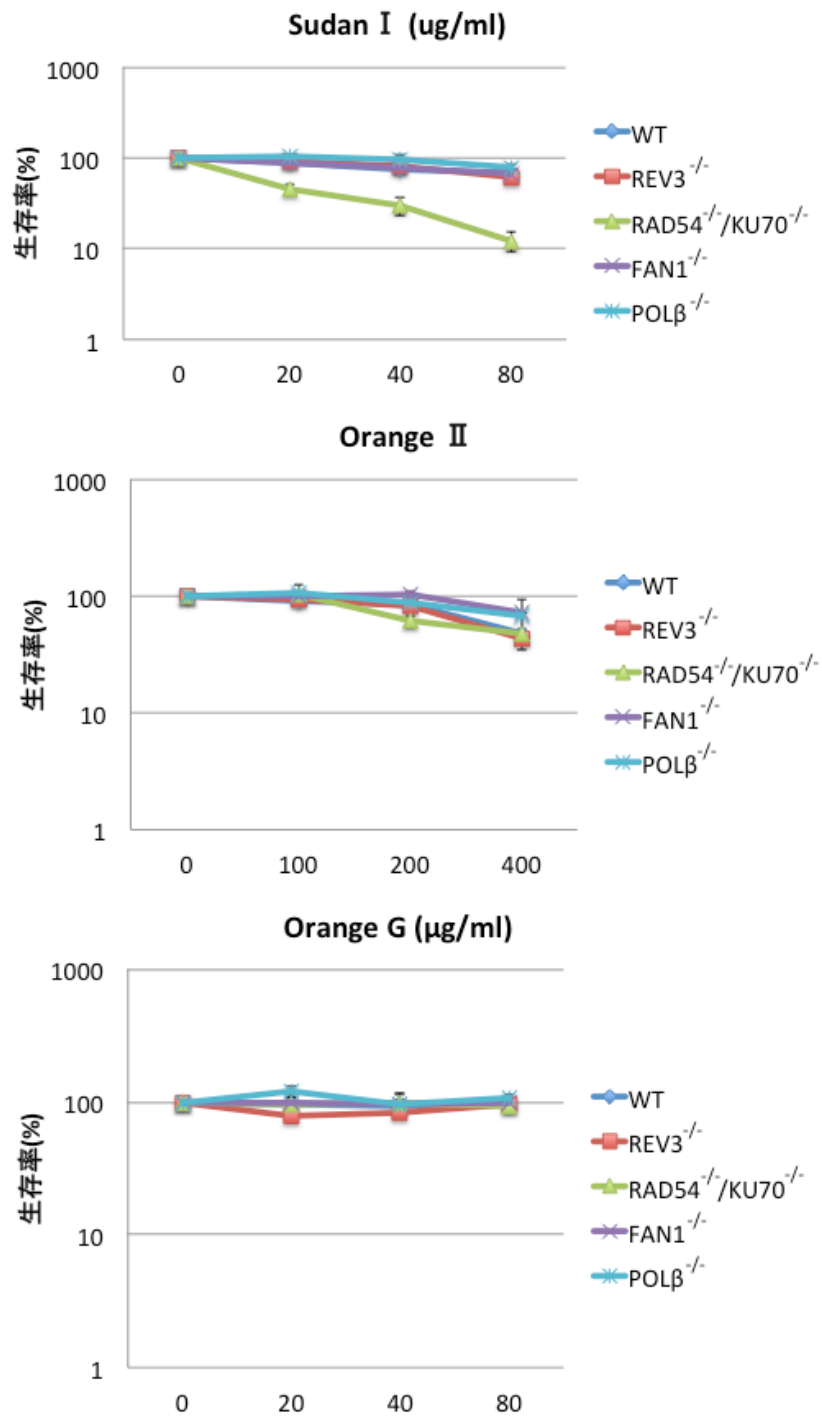


Fig. 5 colony assay 法による生存率試験の結果

ATP assay 法の結果と同様、*RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>変異株のみが Sudan I に対して感受性を示し、*REV3*<sup>-/-</sup>、*FAN1*<sup>-/-</sup>、*POLβ*<sup>-/-</sup>変異株は感受性を示さなかった。エラーバーは 3 回の実験の標準誤差を示している。

Sudan I によって DNA 二本鎖切断が誘導されるという仮説を実証するため、免疫染色法によって Sudan I 暴露後の  $\gamma$  H2AX の局在を観察した。 $\gamma$  H2AX は DNA 二本鎖切断が生じた部位に蓄積するタンパク質であり、その局在は DNA 二本鎖切断のマーカースとして用いられる<sup>22</sup>。免疫染色の結果 Sudan I 暴露によって  $\gamma$  H2AX の局在の数が増加していることを確認した(Fig. 6)。また、Orange II、Orange G 暴露では  $\gamma$  H2AX の局在は未処理の細胞と同程度であった(Fig. 6)。

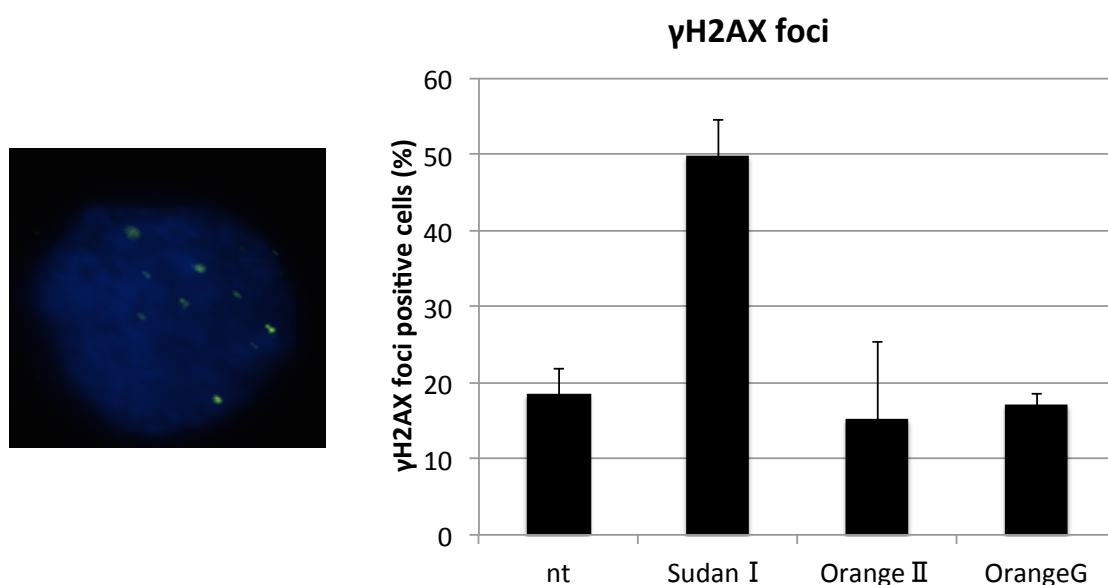


Fig. 6 アゾ化合物で細胞を処理した時の  $\gamma$  -H2AX の免疫染色の結果

(左図)DAPI で染色された核内(青)に  $\gamma$  H2AX の局在(緑)が確認された細胞の代表的な図 (右図)Y 軸:  $\gamma$  H2AX の foci 形成をしている細胞の割合 Sudan I で処理した細胞では何も処理していない細胞に比べて  $\gamma$  H2AX の foci 形成の割合が増加する。エラーバーは 3 回の実験の標準誤差を示している。一回の実験につき、200 個以上の核を観察した。

### **Sudan I は染色体断裂を誘導する**

$\gamma$  H2AX の免疫染色の結果は Sudan I によって DNA 二本鎖切断が誘導されるという仮説に一致している。 Sudan I による DNA 二本鎖切断の誘導をさらに詳しく検証するため、染色体断裂試験を行った(Fig. 7A)。この実験では、姉妹染色体間で断裂が同じ位置に生じているものを iso-chromatid break、姉妹染色体の片方でのみ断裂が生じているものを chromatid break と定義した<sup>1</sup>。細胞を 16 時間 Sudan I、Orange II、Orange

G を含む培地中で培養し、最後の 3 時間でコルセミドを加えて細胞を M 期に細胞を M 期に同調させて回収した。その後、実験方法の項に述べた方法でスライドガラス上に染色体をスプレッドし、ギムザ染色液で染色体を染色した。観察の結果、Sudan I 暴露によって *RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>の細胞で染色体断裂の数が野性型に比べて有意に増加した(Fig. 7B)。染色体断裂は DNA 二本鎖切断の結果起こる<sup>23,24,25</sup>ということから、先に述べた Sudan I によって DNA 二本鎖切断が誘導されることに一致する結果となった。次に、Sudan I で 3 時間処理した細胞の染色体を観察した。この方法では GII 期の細胞が M 期に入るまでの時間が 3 時間であるため、GII 期の細胞のみを選択的に M 期に導入させることができ、染色体断裂が直接誘導されているのか、間接的に誘導されているのかを判断することが出来る<sup>26,27</sup>。この方法を用いて実験を行った結果、*RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>の細胞での染色体断裂の増加は観察されなかった(Fig7. C)。この結果から Sudan I による DNA 二本鎖切断の誘導はおそらく DNA 複製を介して間接的に行われているということが示唆された。

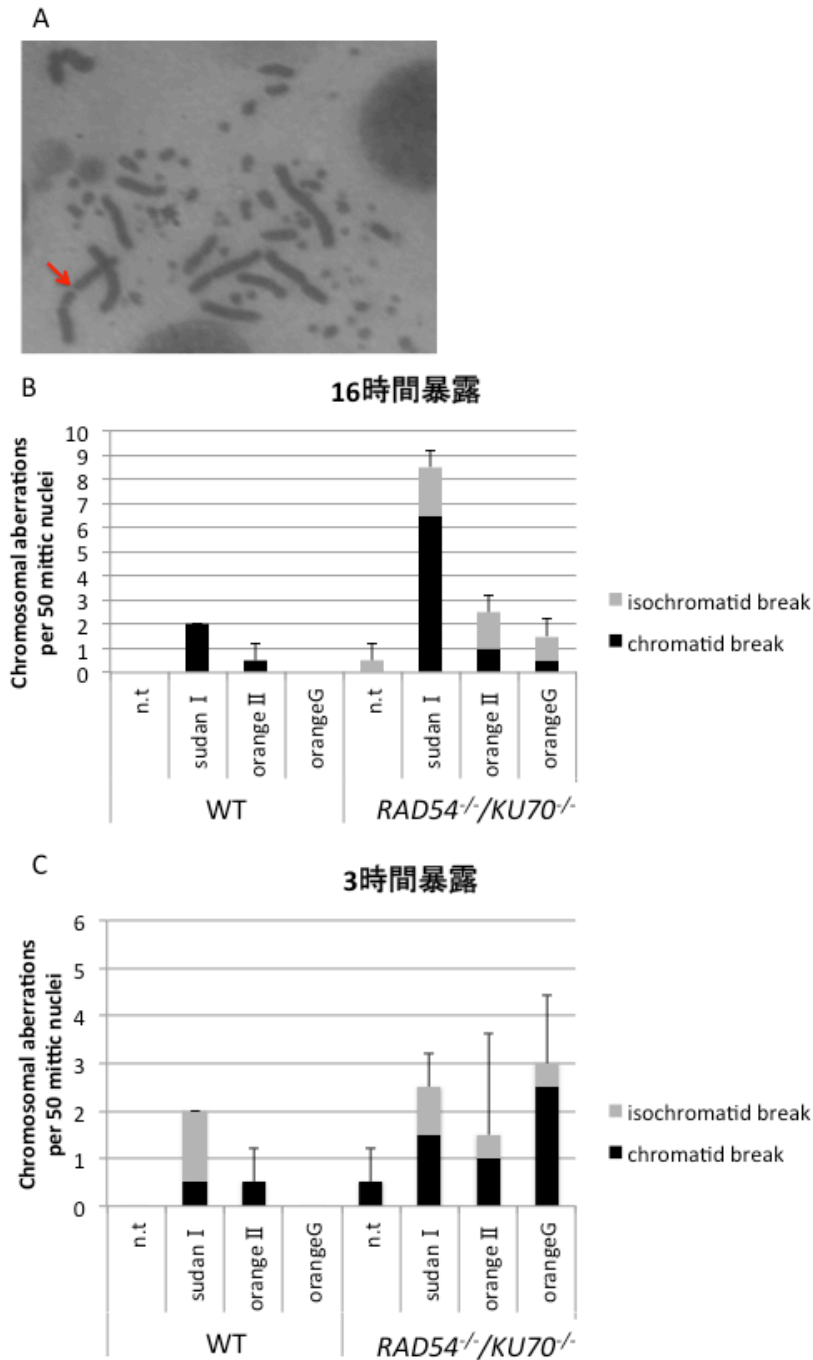


Fig. 7 染色体断裂試験の結果

(A)顕微鏡で観察した染色体断裂の代表的な図 (B)アゾ化合物を含む培地で 16 時間培養した際の M 期の細胞 50 個あたりの染色体断裂の数 (C)アゾ化合物を含む培地で 3 時間細胞を培養した際の M 期の細胞 50 個あたりの染色体断裂の数 エラーバーは 3 回の実験の標準誤差を示している。

## Sudan I は平面構造を持つ

これまでの試験の結果から Sudan I のみが DNA 二本鎖切断を誘導するポテンシャルを持っており、Orange II と Orange G は DNA 二本鎖切断を誘導しないということが明らかとなった。この遺伝毒性の違いが何に起因するのかを明らかにするため、理論化学計算を用いて 3 種のアゾ染料の立体化学構造を計算した。その結果 Sudan I のみが完全な平面構造を持っており、Orange II と Orange G は構造中のスルホン基のため、非常に嵩高い立体構造を持つことがわかった(Fig. 8)。この結果から Sudan I の平面構造が遺伝毒性に影響しているということが示唆された。

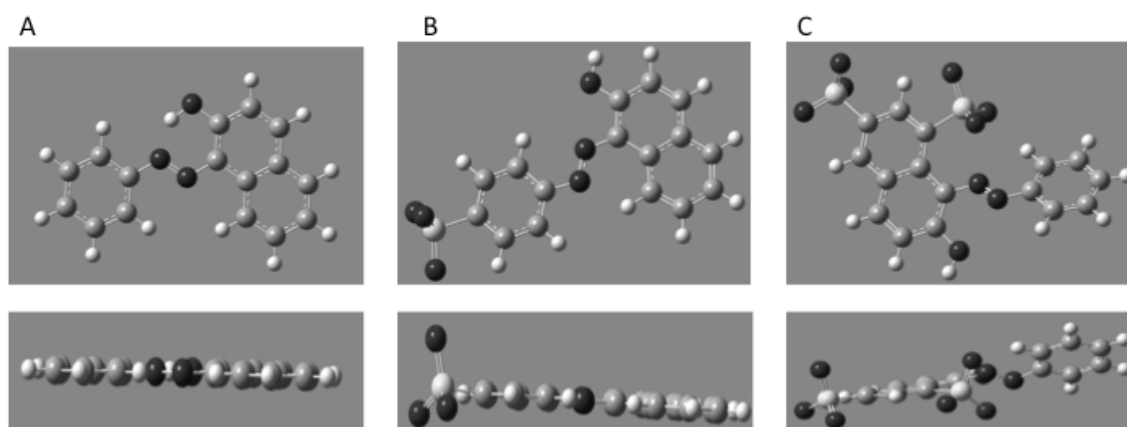


Fig. 8

3 種のアゾ化合物の構造を Gaussian09 で計算した結果

(A)Sudan I (B)Orange II (C)Orange G (上のパネル)各分子の芳香族環を上から見た図 (下のパネル)各分子の芳香族環を横から見た図 Sudan I のみが平面構造を取っており、Orange II と Orange G は嵩高く、歪んだ構造を取っている

本研究では化学構造の非常によく似た 3 種のアゾ化合物、Sudan I、Orange II、Orange G の遺伝毒性試験を行った。Sudan I 暴露時に *RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>の細胞の生存率が野生型細胞に比べて有意に低下したことから、Sudan I によって DNA 二本鎖切断が誘導されることが示唆され、それは  $\gamma$  H2AX の免疫染色、染色体断裂試験の結果で確認された。

Sudan I は完全な平面構造を持つが、Orange II と Orange G はおそらく構造中のスルホン基の影響で嵩高く、歪んだ構造を取っている。平面芳香族環は  $\pi$ - $\pi$  スタッキングによって他の分子と相互作用するため、Sudan I が DNA 二本鎖の塩基間にインターカレ

ートする可能性が考えられる。しかし、Orange II と Orange G の立体構造はスルホン基によって嵩高く、負にチャージしており、その2つの性質が物理的な障壁やクーロン反発を引き起こして DNA との相互作用をブロックしていることが予想される。DNA にスタックした Sudan I は DNA 複製に干渉し、その結果複製フォークの崩壊を介して DNA 二本鎖切断を誘導すると考えられる。この仮説は Sudan I で 3 時間処理した際に染色体断裂の数が増加しなかったことによってサポートされている。このように DNA にインターカレートする分子で知られているものには DAPI やエチジウムブロマイド等が挙げられる。これら 2 種の化合物も分子内に芳香族環を複数もっており、DNA にインターカレートすることで強く結合し、発がん性を持つことが知られている。

遺伝毒性を示す物質の立体化学構造の特徴を調べるため、化学構造の似た 3 種のアゾ化合物の遺伝毒性を調べた。DT40 の変異パネルを用いた遺伝毒性試験方法と理論化学計算を組み合わせることで化合物の立体構造が遺伝毒性に何らかの影響を与えうるという結果が得られた。化学構造と遺伝毒性の関係はさらに研究されていくべき課題である。本研究で扱った化合物は 3 種のみであり、DNA 二本鎖切断の誘導のきっかけとなる構造が平面構造以外にあるかどうかは明らかとなっていない。今後様々な化合物について遺伝毒性試験と立体化学構造計算を併せて行い、芳香族環の数、分子の大きさ、電荷の偏りの強さ、分子内の芳香族環の距離等の因子が遺伝毒性に関わってくるかを調査していく。遺伝毒性と立体化学構造の関係を網羅的に調査し、そのデータベースが充実することは新たな有機化合物が次々と生成される現代において大きな意義を持つ。Ames 試験はヒトとは異なる遺伝学的システムで構成されている原核細胞を使う評価方法であるため、偽陰性や偽陽性が出てしまうことが問題であった<sup>28</sup>。立体化学構造によってリスク評価が行えるようになれば Ames 試験で偽陰性であった化合物でも健康に被害があるかもしれないというより厳しい線引きが出来るようになる。現在行われている安全性試験では Ames 試験によって陽性となった化合物はその後の試験を行うことなく食品や薬品への使用を禁止される。そして Ames 試験で陰性となった化合物をマウスへ継続的に投与し続けて発がん性の有無を調査している。マウスを用いた発がん性の調査は約 2 年の期間がかかるため、時間と費用がかかる検査である。化学物質の構造の特徴から遺伝毒性を推測することが出来るようになることは、マウスを用いた試験を行う前に発がん性を持つ可能性がある化合物の除外を行うことに繋がり、安全試験にかかる費用を削減することにも繋がる。

今回報告した DT40 細胞を用いる遺伝毒性試験方法は既に確立された試験系であるが、細胞を用いる試験であるため、体内で代謝されて毒物となる化合物の遺伝毒性を正確に

試験することが出来ないという問題点がある。その問題点を解決するため、試験管内での代謝を行ってから DT40 を用いた試験系を適応する試験方法の開発を試みた。

### 3-2 DT40 変異株と S9mix 処理を融合した実験系の確立

#### 代謝毒性物質の遺伝毒性試験の確立

DT40 細胞を用いた遺伝毒性試験では代謝後に遺伝毒性を示す化合物の正確な毒性評価が出来ないという問題点を解決するため、試験管内で代謝反応を行い、代謝反応後の化学物質を細胞に暴露することでこの問題点を解決しようと試みた。試験系の確立にあたり、代謝毒物のモデルとして代謝後に遺伝毒性を示すことが知られているベンゾピレン及び N-ニトロソジメチルアミンを用いた。

ベンゾピレンと N-ニトロソジメチルアミンはタバコや食品などに含まれている化学物質の一種である。また工業製品の製造過程での有機物質の不完全燃焼によって発生する気体や工業排水等に含まれているため、環境中へと放出され続けている。これらの化合物の遺伝毒性については既に報告されているが<sup>29,30</sup>、細胞の生存や染色体への影響についてはまだ不明な点が多い。さらに、これらの化学物質による DNA 損傷を修復するためにどの修復経路が働くかについての報告は成されていない。また、これらの化合物は生体内で代謝された後に遺伝毒性を示す代謝毒物であるため<sup>31,32,33</sup>、これまでの DT40 変異パネルを用いた遺伝毒性評価ではその遺伝毒性を評価することが出来ない。そのため、化合物の代謝に Ames 試験でよく用いられている S9mix を用いた試験管内代謝系を応用した。S9mix は雄ラットの腹腔内にフェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボン<sup>34</sup>を投与して薬物代謝酵素を誘引した後に、肝臓を取り出してホモジネートし、9000G、10 分の条件で遠心したものの上清部分にコファクターを加えて試験管内で代謝反応ができるようにする試薬である<sup>34</sup>。S9mix による試験管内での代謝と DT40 変異株による遺伝毒性試験を組み合わせた実験系の完成は着色料や香辛料など幅広い化合物の安全評価方法の確立に繋がると考えられる。



## **S9mix の細胞毒性試験**

ベンゾピレンと N-ニトロソジメチルアミンの代謝に S9mix を使用に先立ち、S9mix 自体が持つ細胞の生存への影響を調べるため、細胞培養液中に S9mix を混合して 2 日間培養し、ATP assay によって生存率を測定した。その結果 S9 の濃度が容量%で 0.6%を超えると生存率が一気に低下するという結果が得られた(Fig. 7)。S9mix は代謝反応を行いたい化学物質と 9:1 で混合して 37°C で 1 時間代謝反応を行う。そこに 10 倍量の細胞懸濁液を加えて 1 時間化合物を暴露する。その後、細胞を 100 倍希釈して 24well plate に移して 2 日間培養して生存率を測定する。この実験条件では化合物暴露時は S9mix の濃度が約 10%、細胞培養時の S9 の濃度は 0.1%となる。細胞培養時の S9 の濃度は細胞の生存に影響しないが(Fig. 9A)、10%の S9mix で 1 時間処理しても細胞に影響が出ないかどうかを確かめるため、細胞を 10%の濃度の S9mix で 1 時間処理し、その後薬剤無しの培地で 2 日間培養して細胞の成長に影響が無いことを確かめた(Fig. 9B)。

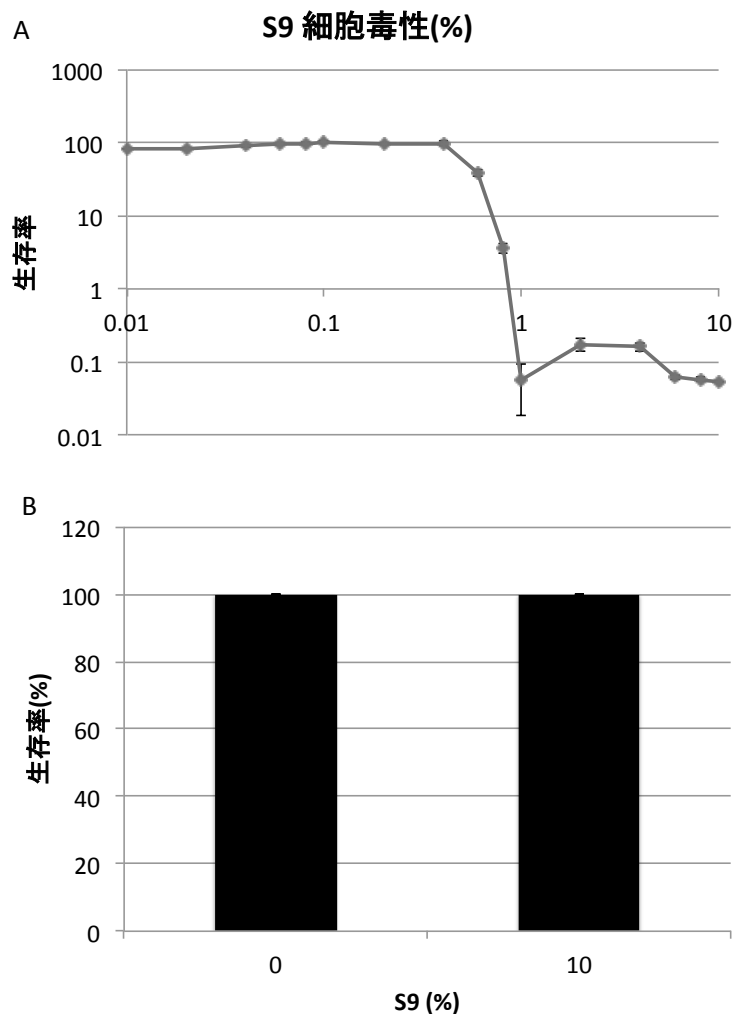


Fig. 9

S9mix 自体の細胞毒性の結果

(A)Y 軸:生存率 X 軸:S9mix の容量%濃度 細胞を S9mix が含まれる培地で 2 日間培養した際の生存率試験の結果 S9 の濃度が 0.4%になると細胞の生育に影響が出始める  
(B)細胞を S9mix で 1 時間処理した際の生存率 S9mix の濃度が 10%でも 1 時間の処理であればその後の細胞の生育に影響は無い

### ベンゾピレンと N-ニトロソジメチルアミンの細胞毒性

ベンゾピレンと N-ニトロソジメチルアミンを細胞に暴露するに先立って、試験管内代謝のために S9mix と混合し、37℃で 1 時間処理した。その後、 $1 \times 10^6/\text{ml}$  の細胞を 500

μl 加え、39.5℃で 1 時間処理した。この時の S9mix の濃度は 10%となるが、1 時間の短期暴露では細胞の生存に影響を与えない(Fig. 9B)。化合物に暴露後、細胞を培地で 100 倍希釈して 2 日間培養し、ATP assay 法を用いて生存率を測定した。その結果、S9mix で代謝した後の化合物で細胞毒性が著しく増加するという結果を得た(Fig. 10A,B)。従って、S9mix 処理によって化合物の性質が変化し、代謝毒物の遺伝毒性を持つようになる化合物の遺伝毒性を検出する実験系の構築が出来ると考え、実験を続けた。

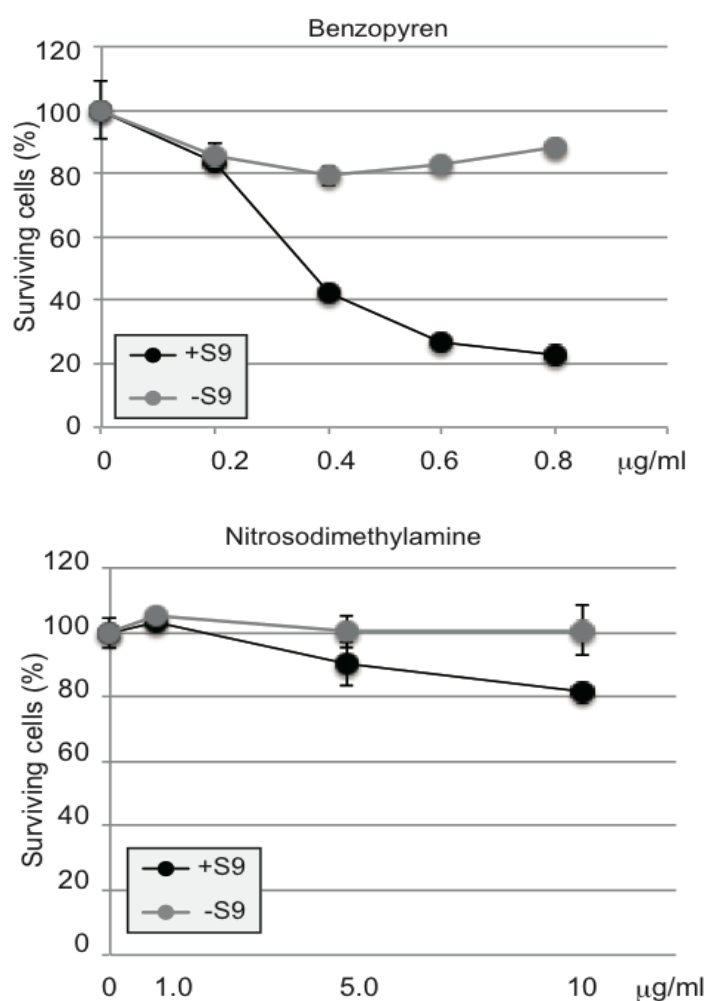


Fig. 10

S9 処理した化合物と未処理の化合物の細胞毒性試験の結果

(A)ベンゾピレン暴露時の細胞の生存率 (B)N-ニトロソジメチルアミン暴露時の細胞の生存率 どちらの化合物も S9 処理によって細胞毒性が増した。Y 軸:生存率 X 軸:化合物の濃度 黒いライン:S9 処理有り 灰色のライン:S9 処理無し

### ***REV3* はベンゾピレンと *N*-ニトロソジメチルアミンによって引き起こされる DNA 損傷への耐性化に重要な役割を果たす**

2 種の化合物によって引き起こされる DNA 損傷の種類を特定するため、使用した遺伝子破壊株の項に挙げた *REV3*<sup>-/-</sup>、*RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>、*FAN1*<sup>-/-</sup>、*POLβ*<sup>-/-</sup>の細胞を使用した。それぞれの細胞に S9 代謝後のベンゾピレンと *N*-ニトロソジメチルアミンを暴露した結果、*REV3*<sup>-/-</sup>の細胞が両方に強い感受性を示した(Fig. 11)。Rev3 は DNA 上のメチル化や DNA 付加体等を乗り越えて複製を続行する損傷乗り越え合成で中心的役割を果たすため、*REV3*<sup>-/-</sup>の細胞は DNA 付加体を形成する化合物に対して強い感受性を示す<sup>6</sup>。この結果はベンゾピレンと *N*-ニトロソジメチルアミンが DNA 付加体を形成するという報告に一致している<sup>30,31,32,33</sup>。興味深いことに *RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>の細胞も代謝後のベンゾピレンに対して高感受性を示した(Fig. 11)。先にも述べたように *RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>の細胞は DNA 二本鎖切断を修復する 2 つの経路が減弱しているため、これはベンゾピレンが代謝後に DNA 二本鎖切断を誘導することを示唆している。ベンゾピレン、*N*-ニトロソジメチルアミンの生存率試験の結果から代謝後に遺伝毒性を示す化学物質の遺伝毒性も S9mix を用いることで DT40 の変異株を使用する実験系によって検出可能であると結論づけた。

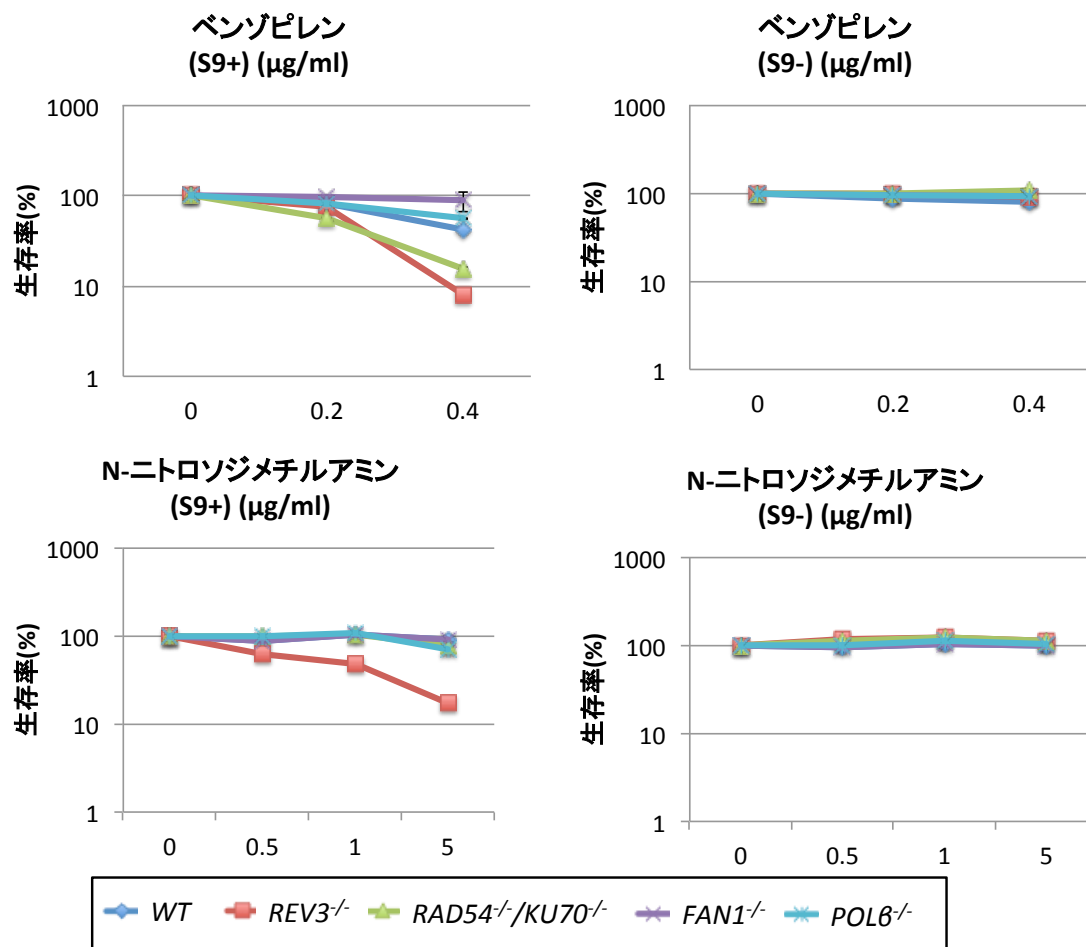


Fig. 11

ベンゾピレンと N-ニトロソジメチルアミンの生存率試験の結果

(左側)S9 代謝有りでの生存率 (右側)S9 代謝無しでの生存率 どちらの化合物に対しても *REV3*<sup>-/-</sup>変異株が感受性を示した。代謝無しの条件では野生型と変異株の間で有意な生存率の差は見られなかった。

ベンゾピレンと N-ニトロソジメチルアミンは染色体断裂を誘導する

*REV3*<sup>-/-</sup>細胞の生存率の低下がベンゾピレンと N-ニトロソジメチルアミンによって誘導された DNA 損傷によるものであることを結論づけるために染色体断裂試験を行った。染色体断裂の評価法はアゾ染料の遺伝毒性試験で行った方法と同じ方法を用いた。S9mix で 1 時間処理した化合物に細胞を 1 時間暴露し、薬剤の入っていない培地で 12 時間培養した。その後、細胞を回収し、スライドガラス上に染色体のスプレッドを作製

して染色体を観察した。その結果、2種の化合物で処理した際、*REV3*<sup>-/-</sup>の細胞で野生型と比較して有意に染色体断裂の数が増加した(Fig. 12)。

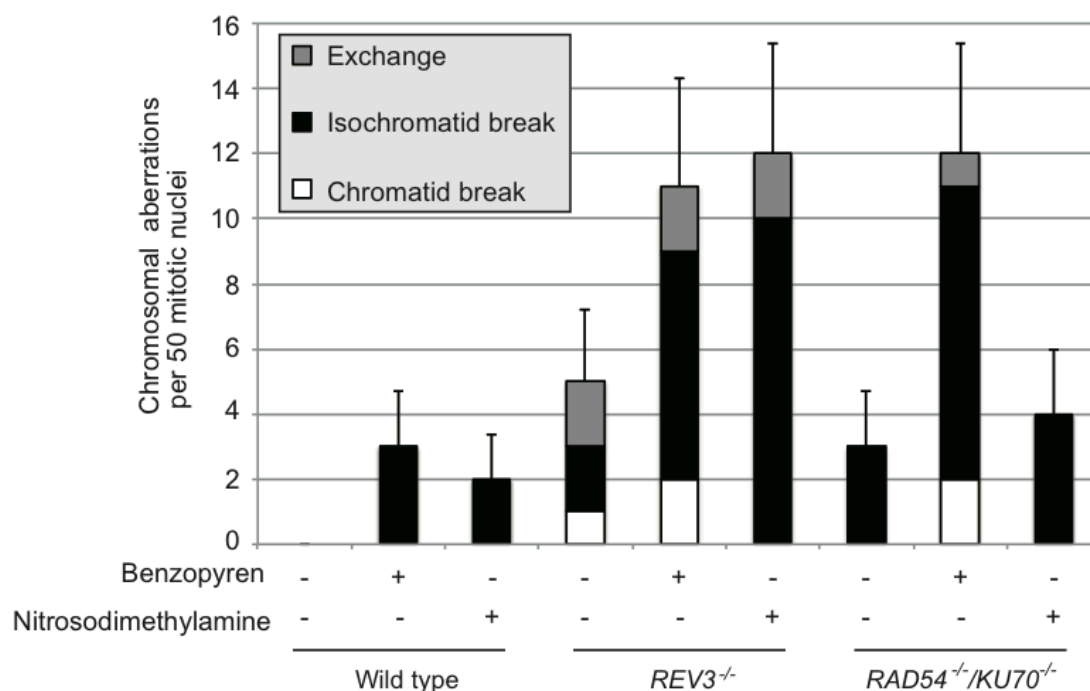


Fig. 12

#### 12 時間暴露時の染色体断裂試験の結果

ベンゾピレン処理時に *REV3*<sup>-/-</sup>変異株と *RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>変異株で断裂の数が増加した。黒いバー:isochromatid break 白いバー:chromatid break 灰色のバー:chromatid exchange

染色体断裂は DNA 二本鎖切断に依存して観察されるが、複製フォークが DNA 損傷部位にぶつかることでも観察されることが報告されている<sup>2</sup>。従って、*REV3*<sup>-/-</sup>の細胞での染色体断裂数の増加は損傷乗り越え合成が出来ないことによる DNA 損傷部位での複製の停止の結果起こった物であると考えられる。次に *RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>細胞がベンゾピレンに感受性を示したことに着目して実験を行った。染色体断裂試験により、*RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>細胞はベンゾピレン処理時に染色体断裂数が増加するという結果を得

た(Fig. 12)。この断裂が複製を介して間接的に誘導されているのか、直接誘導されているのかを調べるため、ベンゾピレン暴露後に 3 時間培養した細胞を回収して染色体を観察した。この方法を用いることで化合物によって誘導される DNA 二本鎖切断が複製を介して間接的に誘導されるのか、複製を介さずに直接誘導されるのかを調べることが出来る。この実験条件でも *RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>細胞で断裂の数が野生型に比べて有意に増加していることから、ベンゾピレンによる DNA 二本鎖切断の誘導は複製を介さなくても起こるということが示唆された(Fig. 13)。

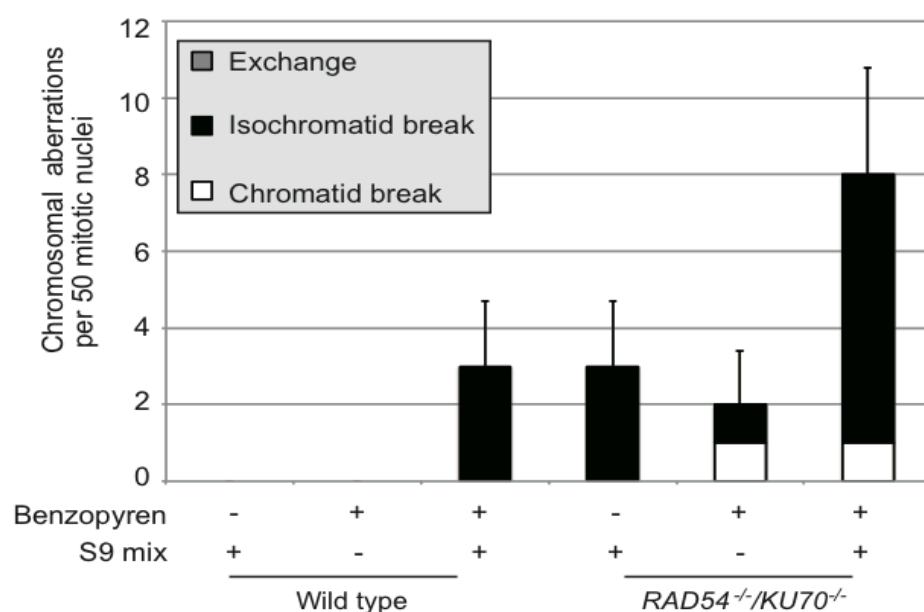


Fig.13 3 時間暴露時の染色体断裂試験の結果

S9 処理後のベンゾピレンによって 3 時間暴露時にも染色体断裂の数が増加したことから、ベンゾピレンは複製を介さずにも DNA 二本鎖切断を誘導していることが示唆された。

本実験で S9mix を用いることで代謝後に毒性を示す化合物の遺伝毒性評価法を確立した。また、この実験系を用いてベンゾピレンと N-ニトロソジメチルアミンの遺伝毒性を評価することに成功した。*REV3*<sup>-/-</sup>細胞は代謝後の両物質に対して高感受性を示し、これらの化合物による DNA 損傷の耐性化には損傷乗り越え合成が重要な働きをしていることが示唆された。この結果はベンゾピレンと N-ニトロソジメチルアミンが DNA 付加体

を形成するという報告に一致している。このことから本研究で確立した実験系は代謝毒物の毒性評価法として信頼性の高い実験系であると考えられる。

*RAD54*<sup>-/-</sup>/*KU70*<sup>-/-</sup>細胞がベンゾピレンに対して感受性を示したことから、ベンゾピレンによって DNA 二本鎖切断が誘導されることが示唆された。実際にベンゾピレン暴露時に染色体の断裂数が増加したことから確かにベンゾピレンによって DNA 二本鎖切断が誘導されていることを確認した。この結果はベンゾピレンが DNA 二本鎖切断を引き起こしうるという報告に一致している<sup>35</sup>。しかし、染色体の断裂は複製フォークの崩壊の結果としても起こるため、ベンゾピレンによる DNA 二本鎖切断が複製を介して誘導されるのか、複製を介さず直接 DNA 二本鎖切断を誘導しているのかを調べた。その結果ベンゾピレンは複製を介さずにも DNA 二本鎖切断を誘導することが明らかとなった。近年、単一塩基の変異よりも染色体の転座が腫瘍発生に重要な要因であることが明らかとなっている<sup>37</sup>。本研究の結果から、ベンゾピレンによる DNA 二本鎖切断がベンゾピレンによる腫瘍発生の要因であるという可能性が示唆された。

代謝活性を必要とする遺伝毒物の評価法の確立は DT40 の変異株を用いた遺伝毒性評価<sup>36</sup>で試験することの出来る化合物の幅を広げることにつながる考えられる。代謝の結果、ベンゾピレンはベンゾピレンジオールエポキシドに変化し、DNA 付加体を形成する。また、N-ニトロソジメチルアミンは代謝によってメチルアミンへと変化し、 $\alpha$ -メチルグアニンを形成する<sup>38</sup>。これら 2 つの化合物による DNA 付加体とベンゾピレンによる DNA 二本鎖切断を検出することが出来た。しかし、代謝後にベンゾピレンによって DNA 二本鎖切断が誘導される機構については不明な点が残っているため、今後の研究でその機構について明らかにしていく。本研究によって代謝毒物がどのような DNA 損傷を誘導するかを明らかにする実験系が確立された。



## 4 まとめと考察

本研究では遺伝毒性を持つ化合物の化学構造の特徴の解明とこれまで細胞を用いた試験では検出が難しかった代謝毒物の遺伝毒性試験方法の確立を目的に実験を進めた。

遺伝毒性を持つ化学構造の解明のため、構造が非常によく似たアゾ化合物である Sudan I と Orange II、Orange G について遺伝毒性試験を行い、Sudan I のみが DNA 二本鎖切断を誘導していることが示唆され、それは染色体断裂試験や  $\gamma$  H2AX の免疫染色によって立証された。そして、それら 3 種の化合物の立体構造を理論化学計算によって求めたところ、Sudan I のみが平面構造を取っていることが明らかとなった。このことは化合物の遺伝毒性が立体構造に影響を受けるという可能性を示唆しており、これまで理解が進んでいなかった遺伝毒性と立体構造の相関を明らかにする上で重要な位置づけとなることが予想出来る。

代謝毒物の遺伝毒性の評価法の確立には Ames 試験で用いられている S9mix を用いることでこれまで培養細胞を用いた試験では検出することが出来なかった代謝毒物の毒性を検出するための試験系の作製に成功した。また、意外にも DNA 付加体を形成することが知られているベンゾピレンが複製を介さずに DNA 二本鎖切断を誘導することも明らかとなった。

今回得た結果は現在行われている化学物質の安全性評価を改善させることに繋がるものとなることが予想される。理論化学による立体構造計算のみだけでなく、分子の大きさや官能基、電荷、その他の遺伝毒性に繋がる特徴が明らかになり、遺伝毒性と構造的な特徴の相関を示すデータベースが充実することは、化学物質の特徴から遺伝毒性を推測出来るようになることに繋がる。そのデータベースに基づき、遺伝毒性が予想される化合物に対しては動物への投与試験を行わないとすることで安全評価にかかる費用を軽減することが出来る。培養細胞を用いることで化合物の細胞に対する影響を約 1 週間で判断することが出来るため、約 2 年かかる動物実験を行うかどうかを迅速に判断することが出来るのに加え、S9mix で化合物を処理することで代謝毒物についても偽陰性・偽陽性を減らすことが出来たため、正確性も大幅に改善されたと言える。しかしながら、本研究で扱った化合物は 5 種のみであり、遺伝毒物の構造的特徴を探るには種類が少ない。今後遺伝毒物の特徴を探るため、化合物ライブラリを用いた数万～数十万種類の化合物の毒性評価をハイスループットスクリーニングによって行う必要がある。

## 5 参考文献

- 1Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death  
Eiichiro Sonoda et al EMBO 1998 17 598-608
- 2Interference in DNA Replication Can Cause Mitotic Chromosomal Breakage  
Unassociated with Double-Strand Breaks Mari Fujita et al 2013 PLOS ONE e60043
- 3XRCC1 and DNA polymerase  $\beta$  in cellular protection against cytotoxic DNA  
single-strand breaks Horton et al 2008 Cell Research 18 48-63
- 4DNA polymerase  $\beta$ -dependent cell survival independent of XRCC1 expression Horton  
et al 2015 DNA repair 26 23-29
- 5Deficiency of FANCD2-Associated Nuclease KIAA1018/FAN1 Sensitizes Cells to  
Interstrand Crosslinking Agents Kratz et al 2010 Cell 142 77-88
- 6Simultaneous Disruption of Two DNA Polymerases, Pol  $\eta$  and Pol  $\zeta$ , in Avian DT40  
Cells Unmasks the Role of Pol  $\eta$  in Cellular Response to Various DNA Lesions Hirota  
et al 2010 PLOS Genetics e1001151
- 7Determination of genotoxic potential by comparison of structurally related azo  
dyes using DNA repair-deficient DT40 mutant panels Ooka et al 2016 Chemosphere  
164 106-112
- 8Cytotoxic and genotoxic profiles of benzo[a]pyrene and N-nitrosodimethylamine  
demonstrated using DNA repair deficient DT40 cells with metabolic activation. Ooka  
et al 2016 Chemosphere 144 1901-1907
- 9<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Genetic%20Toxicology%20Guidance%20Document%20Aug%2031%202015.pdf>
- 10 [http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/acryl\\_amide/a\\_syosai/about/iden.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/acryl_amide/a_syosai/about/iden.html)
- 11 Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional  
of the electron density Lee et al 1988 PhysicsReview B 37 785-789
- 12 Accurate and simple analytic representation of the electron-gas  
correlation-energy Perdew and Wang et al 1992 PhysicsReview B 45 13244-13249

- 13 Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2 Ben Mansour et al 2007 Food and Chemical Toxicology 45 1670–1677
- 14 Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene Peter Moller et al 2000 Mutation Research/Reviews in Mutation Research 462 13–30
- 15 Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. 2002 Cancer Research 62 5678–5684
- 16 In vivo cytogenetic studies on mice exposed to Orange G, a food colourant Giri et al 1988 Toxicology letter 44 253–261
- 17 Testing of sunset yellow and orange II for genotoxicity in different laboratory animal species Wever et al 1989 Environmental and Molecular Mutagenesis 13 271–276
- 18 Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- 19 GaussView, Version5, Roy Dennington, Todd Keith, and John Millam, Semichem, Inc., Shawnee Mission, KS, 2009
- 20 <http://gaussian.com/>
- 21 Identification of genotoxic compounds using isogenic DNA repair deficient DT40 cell lines on a quantitative high throughput screening platform Nishihara et al 2016 Mutagenesis 31 69–81

- 22  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin Kinner et al 2008 Nucleic Acid Research 36 5678-5694
- 23 Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks Richardson et al 2000 nature 405 697-700
- 24 Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations Pfeiffer et al 2000 Mutagenesis 289-302
- 25 Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution Obe et al 2002 Mutation Research 504 17-36
- 26 Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells Takata et al 1998 EMBO 17 5497-5508
- 27 Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of pol  $\zeta$  in maintaining genome stability in vertebrates Sonoda et al 2003 EMBO 22 3188-3197
- 28 Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens : I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. Kirckland et al 2005 Mutation Reserch 584 1-256
- 29 On the impact of the molecule structure in chemical carcinogenesis Luch et al 2009 Molecular, Clinical and Environmental Toxicology 99 151-179
- 30 Carcinogenic Effect of N-Nitrosodimethylamine on Diploid and Triploid Zebrafish (Danio rerio) Mizgireuv et al 2004 Toxicologic Pathology 32 514-518
- 31 Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo Weinstein et al 1976 Science 193 592-595
- 32 DNA-benzo[a]pyrene adducts formed in a Salmonella typhimurium mutagenesis assay system Santella et al 1979 Mutation Research 61 181-189
- 33 DNA adducts and liver DNA replication in rats during chronic exposure to *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and their relationships to the dose-dependence of NDMA hepatocarcinogenesis Souliotis et al 2002 Mutation Research 500 75-87
- 34 <http://www.healthcoat.com/pdf/heniseisikendata.pdf>
- 35 Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: A possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity Tung et al 2014 Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 760 64-69

- 36** Characterization of environmental chemicals with potential for DNA damage using isogenic DNA repair-deficient chicken DT40 cell lines Yamamoto et al 2011 Environmental and Molecular Mutagenesis 52 547-561
- 37** Genomic rearrangements in inherited disease and cancer Chen et al 2010 Seminars in Cancer Biology 20 222-233
- 38** Concurrent Generation of Methylamine and Nitrite during Denitrosation of *N*-Nitrosodimethylamine by Rat Liver Microsomes Keefer et al 1987 Cancer Research 47 447-452

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導頂きました、首都大学東京 理工学研究科 分子物質化学専攻 生物化学教室 廣田耕志 教授に心から深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

論文作成や DT40 遺伝子破壊株を提供して下さった京都大学 医学部 医学研究科 放射線遺伝学教室 武田俊一教授に心から感謝致しますと同時に厚く御礼申し上げます。

量子化学計算に関してアドバイスを頂きました首都大学東京 理工学研究科 分子物質化学専攻 理論化学研究室 筒井隆史氏に心から感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

アゾ化合物の合成にご協力頂いた首都大学東京 理工学研究科 分子物質化学専攻 同位体研究室 秋山和彦助教に心から感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

また、一方ならぬご協力を頂きました首都大学東京 理工学研究科 分子物質化学専攻 生物化学教室の柴田武彦客員教授、田岡万悟准教授、阿部拓也助教、中川万紀子氏、浅田隆大氏、藤井稔彦氏、高沢浩則氏、早川健太郎氏、石川大輔氏、川澄遼太郎氏、小林香氏、高木季代氏、添野公雄氏、上原清孝氏、八巻優佳氏、佐藤亘氏、足立朗氏、梅田未来氏、清水直登氏、小林宏次氏、鍛冶田絹美氏、中里亜利咲氏、小山慎司氏、梅村小雪氏、鈴木雄也氏、千松賢史氏に謝意を申し上げます。

最後に研究生生活を精神的、経済的に支えて頂いた両親に深く感謝致します。